Die enzymatische Hydrolyse von Parpanit und Tropacocain durch Blut und Leber von Ratten

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jani Simkoputra

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Emeritus-Abteilung (R. AMMON) des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. V. ULLRICH

Die enzymatische Hydrolyse von Parpanit und Tropacocain durch Blut und Leber von Ratten

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971

Vorgelegt von

Jani SIMKOPUTRA

geb. am 3. 4. 1945 in Pekalongan

Dekan: Prof. Dr. med. H. KULENKAMPFF
Referent: Prof. Dr. Ammon
Coreferent:

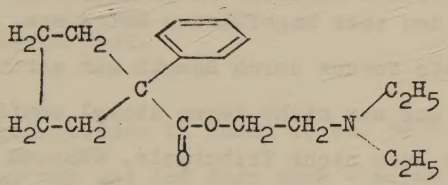
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Prüfung wurde am 20. 11. 1971 abgelegt

Die enzymatische Hydrolyse von Parpanit und Tropacocain durch Blut und Leber von Ratten

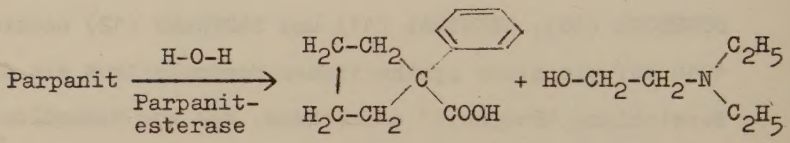
DOMENJOZ (10), GRÜNTHAL (11) und HARTMANN (12) machten 1946 auf ein neues synthetisches Spasmolytikum mit der Bezeichnung "Parpanit" aufmerksam, das zur Behandlung von extrapyramidalen Bewegungsstörungen (Parkinsonismus) empfohlen wurde.

Vom chemischen Standpunkt ist das Parpanit ein Ester, und zwar der Diäthylaminoäthylester der 1-Phenylcyclopentan-1-carbonsäure:



Die Esternatur hat Anlaß gegeben, die Frage zu prüfen, ob im menschlichen bzw. tierischen Organismus eine Esterase vorhanden ist, die das Parpanit hydrolytisch

zerlegen kann. PULVER (15) hat als erster den Nachweis erbringen können, daß es in der Tat eine "Parpanitesterase" gibt":



In dieser Untersuchung zeigte PULVER (15), daß sich das neu entdeckte Ferment von anderen esterspaltenden Fermenten, wie der gewöhnlichen Tributyrinase, Serumlipase und Cholinesterase, unterscheidete. Dies ergab sich schon aus dem Vergleich des Vorkommens der Parpanitesterase mit den eben angeführten Esterasen. Parpanitesterase konnte ferner durch Eserin nur gering beeinflußt werden und war nicht gegen Atoxyl empfindlich. Sie verseifte auch nicht Tributyrin. Während die genannten anderen Esterasen in wohl allen Tieren und Geweben, einschließlich im Blut, nachweisbar sind, fanden PULVER und auch JOUMA (9) z.B. im menschlichen Blut niemals eine parpanitesteratische Wirkung. (Dagegen beobachtete K. AUGUSTINSON (8) eine Aktivität und meinte, Parpanitesterase ist identisch mit der Butyrylcholinesterase).

Interessant war weiterhin die Feststellung PULVERs, daß die Parpanitesterase, die stets in der Leber von Kaninchen vorkommt, sich aber nur in ca. 50 % der Tiere im Blut bzw. Serum dieser Tiere nachweisen läßt.

JOUMA (9), der die Parpanitesterase des Kaninchens eingehender untersuchte, hat ermitteln können, daß es zwei verschiedene Parpanitesterasen gibt, die sich nicht nur durch ihr Vorkommen im Serum, sondern auch durch ihre Molekulargewichte und ihre Spezifität gegenüber anderen Estern unterscheiden:

Parpanitesterase I ist in der Leber aller Kaninchen vorhanden. Sie tritt nur nach Leberschädigung, wie sie durch Thioacetamid zu erhalten ist (2, 3) ins Blut bzw. Serum über.

Parpanitesterase II kommt in ca. 50 % der Kaninchen im Blut vor und ist dann auch - neben der Parpanitesterase I - in der Leber vorhanden.

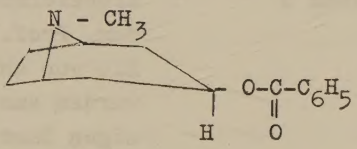
Beim Vergleich dieser beiden Tiergruppen mit den Tiergruppen in bezug auf die Atropinesterase zeigte es sich, daß in den atropinesterase-negativen Kaninchenlebern die Parpanitesterase I enthalten ist, in

atropinesterase-positiven Lebern kommt die Parpanitesterase II vor, sie ist lebergängig und mit der Atropinesterase identisch.

Ziel der Arbeit:

1) Meine Aufgabe sollte es sein, die Parpanitesterase bei Ratten zu untersuchen, wobei speziell Vertreter von erbreinen Tieren auf das Vorkommen der Parpanitesterase im Serum und Leber dieser Tiere geprüft werden sollte. JOUMA (9) hatte lediglich in der Leber von Ratten das Ferment nachgewiesen, ebenso auch PULVER (15).

2) Außer Parpanit stand mir noch ein spezieller Ester, das Tropacocain, auch Benzoyl-pseudotropin genannt, zur Verfügung, den ich zum Vergleich auf seine Spaltbarkeit durch Rattenserum und Rattenleber miteinbezog. Dieser Ester wird durch eine weitgehend unspezifische Esterase, wie es WERNER und Mitarbeiter (17, 18) zeigten, hydrolysiert.



3) Das Verhalten der Parpanitesterase nach Thioacetamidgabe zu untersuchen.

Durchführung der Versuche:

A. Herkunft und Beschreibung der Tiere (6)!

1. Stamm BD V : Phänotyp: Tiere mit sandfarbener Haubenscheckung und roten Augen.
Genotyp: Cpah.

2. Stamm BD VI : Phänotyp: Schwarze Tiere mit dunklen Augen ohne Haubenscheckung.
Genotyp: CPaH.

3. Stamm HW : Im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Abteilung für Biochemische Tumorforschung, Professor Dr. Werth, aus Wistar-Ratten gezüchteter erbreiner Stamm.

4. Stamm R : Krebsforschungs-Institut, Amsterdam, Prof. Dr. Mühlbock.
Die von uns untersuchten Tiere wurden aus der seit 1960 am hiesigen Institut erfolgten Weiterzucht des erbreinen Stamm R entnommen.

Phänotyp : Albino mit hellroten Augen.

Genotyp : cPaH.

Der Angabe des Genotyps mit den Faktoren Cc, Pp, Aa und Hh liegt die Beobachtung DRUCKREYs (14) zu Grunde, daß nur bei Vorliegen des dominanten Allels C eine Pigmentbildung überhaupt möglich ist, während die Faktoren Pp, A und a charakteristischerweise für die Bildung des schwarzen und gelben Pigmentes, und die Faktoren H und h jedoch für die Ausbreitung der Pigmente im Fell verantwortlich sind.

Wir benutzen für den Versuch mindestens 12 Wochen alte Ratten beiderlei Geschlechts.

B. Versuchsmaterial:

1. Parpanit (Caramiphen^{R}) in Reinsubstanz.
   Wir verdanken diesen Ester der Freundlichkeit von Herrn Dr. Pulver in Basel.

2. Tropacocain (Benzoyl-Pseudotropin) stellte uns Herr Professor K. Nádor aus Budapest dankenswerterweise zur Verfügung.

3. Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (1/15 m. p. H. = 7.6) (4)!
   a. Reagenzien: 1. Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 nach SÖRENSEN.
   2. Dinatriumhydrogenphosphat $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ nach SÖRENSEN.
   b. Herstellung 1. 5.938 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ mit dest. Wasser ad 500 ml lösen.
   2. 4.539 g KH_2PO_4 mit dest. Wasser ad 500 ml lösen.

87 ml Lösung (1) mit 13 ml Lösung (2) mischen (unter Kontrolle eines pH-Meters E 300 der Fa. Metrohm, Herisau (Schweiz). Die benutzte Puffer wird später auf pH = 7.2 eingestellt.

C. Methode:

I. Gewinnung des Untersuchungsmaterials (6)

a. Serum : In Äthernarkose wurden die Halsgefäße der Ratten durch Scherenschlag eröffnet. Das gewonnene Blut wurde 15 Minuten bei 2500 U/min und der Überstand noch einmal 15 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Das klare Serum wurde anschließend sofort untersucht.

b. Leberhomogenat :Nach dem Schlachten der Ratte wurde die Leber entnommen und zerkleinert. Die erhaltene Menge wurde mit doppelter Menge Phosphatpuffer (pH = 7.2) im Potter-Pistillhomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 30 Min. bei 4500 U/min in der Christ-Kühlzentrifuge bei -5°C zentrifugiert und der Überstand filtriert und sofort untersucht.

II. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

a. Material

Trägerplatte: Glasplatte von 20 x 20 cm^2

Trägermaterial: Kieselgel G.

Fließmittel: Mischung von N-Butanol: Eisessig : Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 5 (obere Phase).

b. Herstellung der Platte nach STAHL (16)

50 g Kieselgel G wurde mit 100 ml Wasser gemischt und geschüttelt. Dann füllte man die Streichmasse in das Streichgerät ein. Die bereits auf einer Arbeitsschablone gelegenen Platten lassen sich durch Darübergleiten eines entsprechend geführten Streichgerätes in einem Zug beschichten. Die Schichtdicke beträgt 0,5 mm. Die entwickelte Platte blieb über Nacht zum Trocknen liegen; anschließend wurde sie im Trockenschrank für die Dauer von 2 Stunden bei 120°C belassen.

c. Messung der enzymatischen Aktivität

Hier wurde die fermentative Abbauleistung von Parpanit und Tropacocain durch Rattenserum und Leberhomogenat bestimmt.

Als Standardtest benutzten wir ein Gesamtvolumen von 0.3 cm^3 (9, 18).

In dieser Menge sind enthalten:

a. 0,1 cm^3 Serum bzw. 0,1 cm^3 hergestelltes Leberhomogenat.

b. 0,1 cm^3 einer 1%igen wässrigen Lösung von Parpanit bzw. Tropacocain.

c. 0,1 cm^3 Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (pH = 7.2)
Vergleichansätze, bei denen das Serum bzw. Organpräparat durch Wasser ersetzt worden war, dienten zur Beurteilung der nicht-enzymatischen Hydrolyse des Substrats.

Die Testansätze werden in verschlossenen Reagenzgläschen (5 cm^3) bei 37°C im Wasserbad inkubiert, zu verschiedenen Zeiten wurde ein Teil (20 ul bei Standardtest) entnommen und dünnschichtchromatographisch untersucht.

D. Sichtbarmachung

a. In Sprühkabine.

b. Als Sprühmittel diente Dragendorffs-Reagenz nach M. Thies und W. Reuther. Das Reagenz wurde für Diäthylaminoäthanolester, Cyclopentancarbonsäureester, Atropin, Homatropin, Pethidin, Propanidid u.a. verwendet. Diäthylaminoäthanol läßt sich deutlich durch dieses Reagenz mit Spray-Gun anfärben. Da die Färbung der Ester schwach war, wurden die Platten anschließend mit 0,1 N H_2SO_4 angesprüht (9).

Herstellung der Sprühmittel (13)!

2.6 g basisches Wismutcarbonat (24 h über H_2SO_4 1,84 getrocknet) und 7.0 g Natriumjodid werden in 25 ml Eisessig wenige Minuten gekocht. Nach dem Stehen über Nacht wird das ausgefallene Natriumacetat abgesaugt (filtriert). Hierauf werden 20 ml Filtrat und 80 ml Essigsäureäthylester gemischt. 20 ml dieser Lösung, 50 ml Eisessig, 120 ml Essigsäureäthylester und 10 ml Wasser werden in der Weise gemischt, daß das Wasser tropfenweise unter Schütteln zugesetzt wird.

E. Thioacetamidbehandlung der Ratten

JOUMA (9) hatte ermittelt, daß die Parpanitesterase I ins Blut übertritt, wenn die Leber mit Thioacetamid geschädigt wird. Bei der Parpanitesterase II bzw. Atropinesterase tritt nach der Leberschädigung eine Erhöhung des Blutwertes auf, während die normalerweise nicht lebergängige Parpanitesterase I, wie eben erwähnt, nun im Blut erscheint. KAMPHUES und AMMON (7) untersuchten das Verhalten der Dolantinesterase, die nicht im Serum des Kaninchens vorhanden ist, aber stets in der Leber vorkommt. Nach der Thioacetamidbehandlung ist Dolantinesterase im Serum nachweisbar.

Dagegen fand QUINTENZ (5), daß die Propanididesterase, die im Blut und der Leber von Ratten vorhanden ist, keine Veränderung in ihrer Wirkungsstärke im Blut erfährt, wenn die Ratten mit Thioacetamid behandelt werden.

Ich habe daher analoge Versuche angestellt:

25 mg/kg Thioacetamid wurde in die Schwanzvenen gespritzt. Nach 3 und 6 Stunden wurden die Tiere getötet und das Blut und die Leber untersucht. Die

durch Thioacetamid hervorgerufene Lebernekrose gab sich durch die starke Erhöhung der SGOT- und SGPT-Werte zu erkennen. Die Erhöhung der SGOT ist stärker als SGPT. Die hydrolytische Spaltbarkeit der Parpanitesterase blieb aber unverändert (nach dünnschichtchromatographischem Befund).

F. Ergebnisse:

Spaltbarkeit von Parpanit und Tropacocain

Es wurden insgesamt 51 erbreine Ratten verschiedener Stämme, davon 30 Männchen und 21 Weibchen, untersucht. Bei allen diesen Tieren wurde, unabhängig von Rasse und Geschlecht, eine enzymatische Spaltung von Parpanit und Tropacocain durch Serum und Leberhomogenat ermittelt. Die Spaltung im Serum scheint etwas stärker zu sein als die des Leberhomogenats, wie es anhand der größeren Flecken in den Dünnschichtchromatogrammen angenommen werden kann. In den Abbildungen 1 und 2 sind dünnschichtchromatographische Bilder wiedergegeben.

In der Abbildung 1 ist die Spaltung von Parpanit durch Rattenserum und Leberhomogenat ersichtlich.

Abb. 1 Die schematische Darstellung der Ergebnisse der hydrolytischen Spaltung von Parpanit auf der dünnschichtchromatographischen Platte.

Bahn 1: Parpanit + Rattenserum vor der Inkubation,

Bahn 4: Parpanit + Rattenserum nach 3-stündiger Inkubation: deutliche Spaltung von Parpanit durch Serum,

Bahn 7: Parpanit + Rattenserum nach 24-stündiger Inkubation: totale Spaltung von Parpanit durch Rattenserum,

Bahn 2: Parpanit + Rattenleberhomogenat vor der Inkubation,

Bahn 5: Parpanit + Rattenleberhomogenat nach 3-stündiger Inkubation:
deutliche Spaltung von Parpanit durch Leberhomogenat,

Bahn 8: Parpanit + Rattenleberhomogenat nach 24-stündiger Inkubation:
fast vollständige Spaltung,

Bahn 3: Eigenhydrolyse von Parpanit vor der Inkubation,

Bahn 6: Eigenhydrolyse von Parpanit nach 3-stündiger Inkubation:
keine Spaltung,

Bahn 9: Eigenhydrolyse von Parpanit nach 24-stündiger Inkubation:
ganz geringe Eigenhydrolyse,

Bahn 10: N-diäthyl-amino-äthanol.

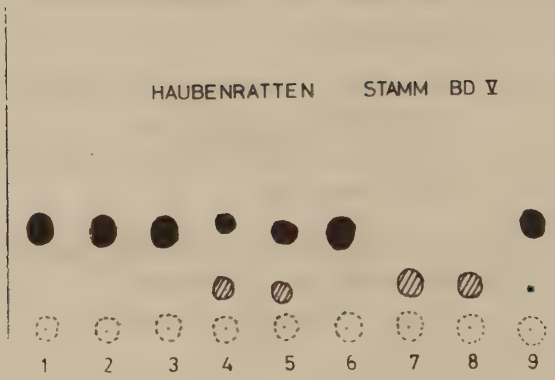


Abb. 2 HAUBENRATTE (Stamm B DV)

Die schematische Darstellung der Ergebnisse der hydrolytischen Spaltung von Tropacocain auf der dünnschichtchromatographischen Platte.

Bahn 1: Tropacocain + Rattenserum vor der Inkubation,

Bahn 4: Tropacocain + Rattenserum nach 3-stündiger Inkubation:
deutliche Spaltung von Tropacocain durch Rattenserum,

Bahn 7: Tropacocain + Rattenserum nach 24-stündiger Inkubation:
totale Spaltung von Tropacocain durch Rattenserum,

Bahn 2: Tropacocain + Rattenleberhomogenat vor der Inkubation,

Bahn 5: Tropacocain + Rattenleberhomogenat nach 3-stündiger Inkubation:
deutliche Spaltung von Tropacocain,

Bahn 8: Tropacocain + Rattenleberhomogenat nach 24-stündiger Inkubation:
totale Spaltung von Tropacocain,

Bahn 3: Eigenhydrolyse von Tropacocain vor der Inkubation,

Bahn 6: Eigenhydrolyse von Tropacocain nach 3-stündiger Inkubation:
ganz geringe Eigenhydrolyse.

Die beiden Abbildungen sind charakteristisch für alle Versuche, d. h. es wurden nahezu identische Ergebnisse bei den angeführten Rattenrassen erhalten, wie es aus der folgenden Zusammenstellung auch hervorgeht.

Vorkommen der Parpanit- und Tropacocain-spaltenden Enzyme:

Stamm	BD V	BD VI	Hw	R
Anzahl der Tiere	20	6	10	15
Männchen	10	0	10	10
Weibchen	10	6	0	5

Zusammenfassung:

1) Mittels dünnschichtchromatographischer Methode wurde die enzymatische Spaltbarkeit von Parpanit und Tropacocain durch Rattenserum und Rattenleber erbreiner Tiere untersucht.

2) Alle Tiere, d. h. unabhängig von der Zugehörigkeit zu bestimmten Rassen und zum Geschlecht, waren imstande, die beiden Ester aufzuspalten.

3) Es kann daher angenommen werden, daß keine solche genetisch bedingte Beziehung, wie sie für die Atropinesterase = Parpanitesterase II bei Kaninchen besteht, vorhanden ist.

4) Die beiden Fermente der Rattenstämme, die Parpanitesterase und Tropacocainesterase dürften wohl den Pseudocholinesterasen nahestehen.

5) Wird durch Thioacetamid bei den untersuchten Rattenstämmen eine Lebernekrose erzeugt, die sich durch das Ansteigen der Werte für die SGOT und SGPT zu erkennen gibt, so erfolgt kein Anstieg der Parpanitesterase im Blut. Diese Beobachtung schließt an die analoge Feststellung bei der Propanididesterase an. Auch hier erfolgte kein Anstieg der Blutwerte nach Thioacetamidgabe. Eine Erklärung steht noch aus.

Literaturverzeichnis:

1) AMMON, R. und SAVELSBERG, W.: Die enzymatische Spaltung von Atropin, Cocain und chemisch verwandten Estern. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 284 (1949): 135

2) AMMON, R.: Zur Thioacetamid-Leberzirrhose des Kaninchens. Gastroenterol. 2 (1964): 137

3) AMMON, R. und PIROTH, M.: Das Verhalten der Transaminase als Frühsymptom der Thioacetamid-Vergiftung des Kaninchens. Gastroenterol. 3 (1965): 92

4) AMMON, R. und MERCK, W. Die Anwendung des Hydroxamat-Verfahrens zur colorimetrischen Bestimmung der Atropin- und Cocain-esterase. Enzymologia 36 (1969): 239

5) AMMON, R. und QUINTENZ, M.: Anreicherung und Charakterisierung eines Propanidid-spaltenden Enzyms aus Rattenleber. Arzneimittelforsch. 1971. Im Druck

6) AMMON, R. und HILLERT, E.: Das Vorkommen der Atropinesterase bei Ratten als Kriterium der Erbgleichheit. Enzymologia 38 (1970): 168

7) KAMPHUES, V. und AMMON, R.: Eigenschaften und Substratspezifität der Dolantinesterase aus Kaninchenleber. Enzymologia 37 (1969): 356

8) AUGUSTINSON, K.B.: Neue Ergebnisse auf dem Gebiet der Cholinesterasen und ihre Bedeutung für Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelforsch. 4 (1954): 242

9) JOUMA, M.: Die Parpanitesterasen und ihre Abgrenzung gegen andere Acylhydrolasen. Inauguraldissertation, Saarbrücken 1969.

10) DOMENJOZ, R.: Parpanit, ein neues Therapeutikum bei Störungen der extrapyramidalen Motorik. Schweiz. med. Woch. 1946: 1282

11) GRÜNTHAL, E.: Über Parpanit, einen neuen, extrapyramidalmotorische Störung beeinflussenden Stoff. Schweiz. med. Woch. 1946: 1286

12) HARTMANN, K.: Erfahrungen mit dem neuen Präparat "Parpanit" bei der Behandlung von Erkrankungen des extrapyramidalen motorischen Systems. Schweiz. med. Woch. 1946: 1289

13) Chem. Fabrik E. MERCK, Darmstadt — Anfärbereagenzien für Dünnschicht-Chromatographie

14) DRUCKREY, H., DANNEBERG, P., DISCHLER, W., STEINHOFF, S.: — Reinzucht von 10 Rattenstämmen (BD-Stämme) und Analyse des genetischen Pigmentierungssystems. Arzneimittelforsch. 12 (1962): 912

15) PULVER, R.: — Über Resorption, Abbau und Ausscheidung von Parpanit im Organismus. Arch. Pharmacodyn. 86 (1951): 185

16) STAHL, E.: — Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag (1967).

17) WERNER, G., SEILER, N., KAMENIKOVA, L.: — Versuche zur Charakterisierung der Tropacocainesterase. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349 (1968): 692

18) WERNER, G. und BREHMER, G.: — Zur Stereospezifität der Hyoscyamin-Acylhydrolase des Kaninchens. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 384 (1967): 1640

Danksagung

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. med., Dr. phil. R. Ammon, möchte ich hier für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung, die er mir während der Arbeit gegeben hat, herzlich danken.

Ferner danke ich auch Frau Professor Dr. med. G. Werth, Fräulein Schattauer und allen Mitarbeitern des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität des Saarlandes, die mir ständig wertvolle Ratschläge und Hilfe gegeben haben.

Lebenslauf

3. 4. 1945	als fünftes Kind des Kaufmannes Kho, Jan Siem, und seiner Ehefrau Oey Soe Tiu in Pekalongan, Java, geboren.
1951 - 1957	Besuch der Volksschule in Djakarta.
1957 - 1963	Besuch der Mittel- und Oberschule "J.P.P." in Djakarta. Anschließend Ablegung der Reifeprüfung für den Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Zweig des Staatlichen Abituriums (S.M.A. Bag. B).
1963 - 1964	Studium der Medizin an der Universität "Trisakti" in Djakarta.
1. September bis 31. Oktober 1964	Besuch des Goethe-Instituts für deutsche Sprache in Staufen im Breisgau.
November 1964 bis März 1965	Besuch des Studienkollegs der Universität des Saarlandes für die deutsche Sprache und anschließend Ablegung einer Feststellungsprüfung.
April 1965	Beginn des medizinischen Studiums an der Saarländischen Universität.
7. 3. 1966	Vorphysikum in Saarbrücken.
4. 4. 1968	Physikum in Homburg/Saar.

1968 - 1969	Klinisches Studium in Hamburg.
1969 - 1971	Klinisches Studium in Homburg/Saar und gleichzeitige Durchführung meiner Doktorarbeit im Physiologisch-Chemischen Institut bei Prof. Dr. med. Ammon.
13. Juli 1971	Beendigung des medizinischen Staatsexamens.